

# 高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中酪蛋白磷酸肽的含量

葛城<sup>#</sup>, 张浩<sup>#</sup>, 黄缘, 周钧\*, 易灿

[澳优乳业(中国)有限公司, 长沙 410200]

**摘要: 目的** 建立高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中酪蛋白磷酸肽含量的方法。**方法** 对婴幼儿配方乳粉样品对应生产批次所采用的酪蛋白磷酸肽原料进行测定, 得到准确含量后作为参照品, 对婴幼儿配方乳粉样品测定前处理中净化、提取条件进行优化, 采用二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)定量分析。**结果** 采用混合型阳离子交换(mixed cation exchange, MCX)固相萃取柱、ZORBAX Eclipse AAA 色谱柱可得到良好的分离效果, 酪蛋白磷酸肽在 100~500  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好, 相关系数  $r^2$  为 0.9994, 检出限为 0.140 mg/100 g, 加标回收为 81.06%~87.78%, 相对标准偏差为 3.64%。**结论** 该方法前处理操作简单, 具有良好的重现性和准确性, 能够满足婴幼儿配方乳粉中酪蛋白磷酸肽含量的测定。

**关键词:** 婴幼儿配方乳粉; 酪蛋白磷酸肽; 高效液相色谱法

## Determination of casein phosphopeptides in infant formulate milk powder by high performance liquid chromatography

GE Cheng<sup>#</sup>, ZHANG Hao<sup>#</sup>, HUANG Yuan, ZHOU Jun\*, YI Can

[Ausnutria dairy (China) Co., Ltd, Changsha 410200, China]

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of casein phosphopeptide in infant milk powder by high performance liquid chromatography. **Methods** The raw material of casein phosphopeptide used in the corresponding production batch of infant formula milk powder was determined. After the accurate content was obtained, it was used as the reference material. The purification and extraction conditions in the infant formula milk powder samples pretreatment were optimized, and the quantitative analysis was performed by diode array detector (DAD). **Results** A good separation effect can be obtained by using mixed cation exchange (MCX) solid phase extraction column and ZORBAX Eclipse AAA column. Casein phosphopeptide had a good linear relationship in the range of 100-500  $\mu\text{g/mL}$ , and the correlation coefficient  $r^2$  was 0.9994. The limit of detection was 0.140 mg/100 g, the recoveries of standard addition were 81.06%~87.78%, and the relative standard deviation was 3.64%. **Conclusion** The method is simple, reproducible and accurate, and can satisfy the determination of casein phosphopeptide in infant formula milk powder.

**KEY WORDS:** infant formula milk powder; casein phosphopeptide; high performance liquid chromatography

<sup>#</sup>葛城与张浩为共同第一作者。

<sup>#</sup>GE Cheng and ZHAN Hao are Co-First Authors.

\*通信作者: 周钧, 硕士, 工程师, 主要研究方向为实验室管理和乳品质量控制工作。 E-mail: junzhou@ausnutria.com

\*Corresponding author: ZHOU Jun, Master, Engineer, Test Centre of Ausnutria Dairy (China) Co., Ltd, Changsha 410200, China. E-mail: junzhou@ausnutria.com

## 0 引言

作为婴幼儿主要食物来源之一的婴幼儿配方乳粉备受国家重视, 为了使婴幼儿配方乳粉能够确保宝宝的发育与健康, 产品中的营养元素和配方需要精心设计<sup>[1]</sup>。其中, 酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptid, CPP)能够促进婴幼儿对钙等必需元素的吸收, 是一种很好的促进吸收的营养物质。

CPP 是利用单一或复合蛋白酶水解牛奶酪蛋白、经生物技术制得的多肽, 具有生物活性<sup>[2]</sup>, 核心结构可表示为 -Pse-Pse-Pse-Glu-Glu-(Pse: 磷酸丝氨酸残基, Glu: 谷氨酸)<sup>[3]</sup>。在小肠的弱碱性环境中, CPP 与钙、铁、锌、硒等有着螯合作用, 可以防止这些必需金属元素沉淀, 促进小肠对其的吸收利用<sup>[4-8]</sup>。在婴幼儿配方奶粉中添加 CPP, 能够帮助婴幼儿对矿物质的吸收, 促进其生长发育。日本等国家已将 CPP 作为功能性组分加入到食品, 我国也将其作为食品强化剂应用于婴幼儿配方奶粉中<sup>[9-11]</sup>。

对于 CPP 的检测, 目前的方法有: 电泳法<sup>[12-13]</sup>、钡盐沉淀法<sup>[14]</sup>、高效液相色谱法<sup>[15-18]</sup>、高效液相色谱-串联质谱法<sup>[19-20]</sup>等。采用高效液相色谱法检测 CPP 有操作简单快捷、检测周期短、准确度高特点, 然而文献中高效液相色谱法鲜少使用固相萃取柱对样液进行净化处理, 而婴幼儿配方乳粉这类样品基质复杂, 可能对 CPP 特征峰的选择和定量存在影响, 同时也会影响色谱柱柱效, 后期对目标峰的分离有一定影响, 而有研究表明采用离子交换技术可以对 CPP 起到净化效果<sup>[21]</sup>。本研究采用高效液相色谱法对婴幼儿配方乳粉样品中的 CPP 含量进行测定, 通过利用离子交换固相萃取柱对样品进行了净化处理, 减少了样液中的杂质, 同时 CPP 特征峰有着良好的分离度与峰面积, 能够满足日常检测的需求, 也为相关标准的制定提供一定的参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器、材料与试剂

Agilent1260 型高效液相色谱分析仪[配备二极管阵列检测器(diode array detector, DAD), 美国安捷伦仪器有限公司]; ME204E 型分析天平、FE28-Standard 型 pH 计(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); 3K15 型冷冻离心机(德国 SIGMA 公司); SB-5200D 型超声波振荡器(宁波新芝有限公司); MTN-2800D 型氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); EOFO-945616 型涡旋混合器(美国 TALBOYS 公司); HERATHER OGH100 型电热鼓风干燥箱(美国 THERMO FISHER 科技公司)。

乙腈、甲醇、乙酸(色谱纯, 德国 CNW 公司); 三氟乙酸、三氯乙酸(优级纯, 天津科密欧公司); 氨水、无水乙醇、二水合氯化钡、盐酸、氢氧化钠(分析纯, 国药集团化学试

剂有限公司); 0.45 μm 水系滤膜(上海安谱公司); 3 mL 混合型阳离子交换(mixed cation exchange, MCX)固相萃取柱(德国 CNW 公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水;

某市售婴幼儿配方乳粉, 对应批次 CPP 原料。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 溶液配制

三氯乙酸溶液(15 g/L): 称取 7.5 g 三氯乙酸, 加水定容到 500 mL; 氨水甲醇溶液(5%): 准确量取 5 mL 氨水和 95 mL 甲醇, 充分混匀; 氯化钡溶液(100 g/L): 准确称取 11.73 g 二水合氯化钡, 加水溶解并定容至 100 mL; 盐酸溶液: 取 18 mL 浓盐酸慢慢加入 100 mL 水中; 氢氧化钠溶液(80 g/L): 准确称取 8 g 氢氧化钠, 加水溶解并定容至 100 mL。

#### 1.2.2 CPP 原料分析

参照 GB 31617—2014《食品安全国家标准 食品营养强化剂 酪蛋白磷酸肽》<sup>[14]</sup>, 称取试样 1.0 g(精确至 0.0001 g)于 1 个 50 mL 离心管 A 中, 加入 15 mL 水使其完全溶解。用盐酸溶液调节试样溶液的 pH=4.6, 然后置于冷冻离心机中, 以 4 °C, 5000 r/min 的速度离心 30 min, 取上清液于预先在 105 °C 恒重的另 1 个 50 mL 离心管 B 中, 用氢氧化钠溶液调节此上清液的 pH=6.8, 控制溶液总量在 20 mL 以内, 加入氯化钡溶液 1.5 mL, 再加入无水乙醇至 50 mL, 摇匀后于 4 °C 冰箱中冷藏 12 h 后, 以 5000 r/min 离心 30 min, 弃去上清液得沉淀物。沉淀物先在 60~70 °C 干燥箱中烘 1 h, 再升高温度至 105 °C 烘至恒重。原料中 CPP 含量按以下式(1)计算。

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m \times (1 - \omega_0)} \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $\omega$  为原料中 CPP 含量, %;  $m_1$  为恒重后离心管 B 和沉淀物的质量, g;  $m_2$  为离心管 B 的质量, g;  $m$  为 CPP 原料称样量 g;  $\omega_0$  为试样的干燥减量, %。

#### 1.2.3 婴幼儿配方乳粉样品前处理

称取 2 g 样品(精确到 0.001 g)于 100 mL 烧杯中, 用 20 mL 40~50 °C 超纯水溶解。超声 10 min, 用 15 g/L 三氯乙酸调节溶液 pH 至 4.5±0.1, 转移至 50 mL 容量瓶中, 用水定容, 混匀, 过滤待净化。

MCX 固相萃取柱依次用甲醇 3 mL 和水 3 mL 活化, 取待净化液 5 mL 过柱, 控制流速(约 3~4 s 每滴), 再依次用水 3 mL 和甲醇 3 mL 淋洗, 再用 5% 氨水甲醇溶液 6 mL 洗脱, 收集洗脱液, 于 50 °C 氮气吹干。用水 1 mL 溶解残渣, 涡旋混匀, 0.45 μm 水相微孔滤膜过滤。

称取适量已测含量的酪蛋白磷酸肽原料于 100 mL 烧杯中, 用 20 mL 40~50 °C 超纯水溶解, 超声 10 min, 用 15 g/L 三氯乙酸调节溶液 pH 至 4.5±0.1, 溶液用水转移并定容于 50 mL 刻度试管中, 混匀, 过滤得参考物质储备液约 10 mg/mL。分别吸取 0.10、0.15、0.20、0.30、0.40、0.50 mL 参考物质储备液于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至

刻度,得到酪蛋白磷酸肽的质量浓度为 100、200、300、400、500  $\mu\text{g/mL}$  的系列标准工作溶液(根据样品中酪蛋白磷酸肽的含量,标准曲线浓度可做适当调整)。

所得样液与系列标准工作溶液一起进高效液相色谱仪检测。

#### 1.2.4 高效液相色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse AAA 柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 280 nm; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ , 流动相: A 为 0.1% 乙酸乙腈, B 为 0.1% 乙酸水溶液。梯度洗脱条件: 0~30 min 内, A 相由 5% 上升至 45%, B 相由 95% 下降至 55%; 30.1~31 min 内, A 相由 45% 下降至 5%, B 相由 55% 上升至 95%, 保持 5 min 后停止。

## 2 结果与分析

### 2.1 原料中 CPP 含量测定结果

采用 1.3.1 方法对所用批次的原料进行多次测定, 所得实验结果如下表 1。实验检测平均结果为 33.0% (将该批次原料送检权威机构, 得到检测结果为 31.7%), 相对标准偏差(relative standard deviation)为 1.26%, 结果比较准确。

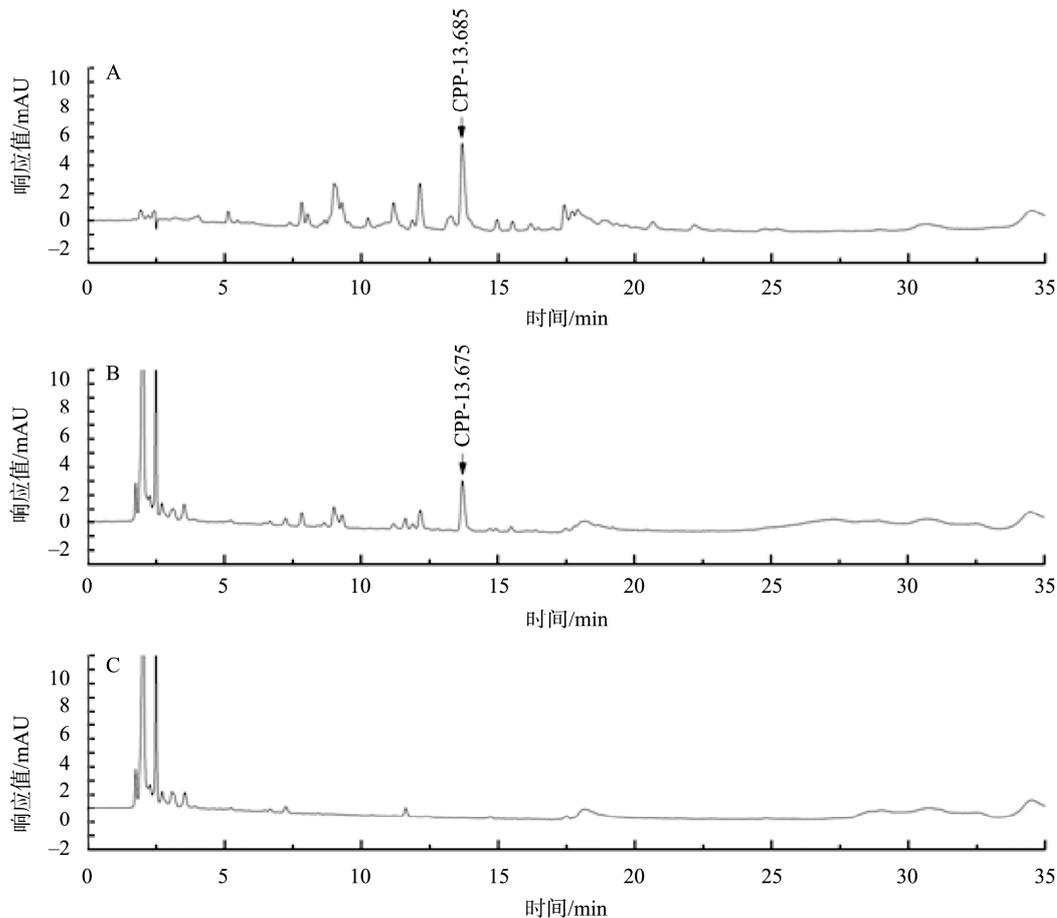
表 1 原料中 CPP 含量测定结果

Table 1 Determination results of CPP content in raw materials

编号	称样量/g	CPP 含量/%	平均值/%	相对标准偏差/%
1	1.0051	32.9		
2	1.0045	33.4		
3	1.0027	33.5		
4	1.0023	33.3	33.0	1.26
5	1.0018	32.5		
6	1.0015	32.8		
7	1.0035	32.5		

### 2.2 CPP 色谱图特征峰的选择

采用空白样品、阳性样品、系列标准工作溶液进行比对, 选择 CPP 的特征峰, 如图 1 所示。保留时间为 13.68 min 时系列标准溶液和阳性样品均有出峰, 而空白样品无杂峰, 同时该峰型良好, 与其他峰分离度高, 因此可确定保留时间为 13.68 min 的峰为 CPP 的特征峰。



注: A 为标准工作溶液, B 为添加 CPP 样品, C 为空白样品。

图 1 CPP 特征峰

Fig.1 The characteristic peak of CPP

### 2.3 婴幼儿配方乳粉样品前处理方法优化

由于婴幼儿配方乳粉中含有多种营养元素, 基质十分复杂, 占比大的蛋白质也会对 CPP 的定量分析造成很大的干扰, 同时也会降低色谱柱柱效, 缩短色谱柱使用寿命, 因此去除蛋白质是实验的关键步骤。本研究从等电点沉淀试剂的选择、样液净化方式进行了探究。

#### 2.3.1 等电点沉淀试剂的选择

本研究选用了盐酸溶液与三氯乙酸溶液对同一样品进行 pH 值的调节, 并对采用三氯乙酸溶液处理的方案进行了加标回收实验, 实验结果如表 2 所示, 采用盐酸溶液处理后的结果均略低于采用三氯乙酸溶液处理后的结果, 采用三氯乙酸溶液方案其回收率为 85.3%, 故采用三氯乙酸溶液调节 pH 结果将更靠近真值。

表 2 盐酸与三氯乙酸调节 pH 结果对比  
Table 2 Comparison of test results between HCl and trichloroacetic acid for pH adjusting

样液编号	采用盐酸溶液测试结果/(mg/100 g)	采用三氯乙酸溶液测试结果/(mg/100 g)
1	71.3	73.2
2	72.6	73.2
3	73.8	76.7

#### 2.3.2 样液净化方式的选择

为了净化样液, 实验从 2 种方式进行了考察, (1)直接

采用滤纸过滤, (2)采用 MCX 固相萃取柱法, 而未选择离心的方式是因为有相关文献报道称: 采用离心的方式可能会损失 CPP 的特征峰<sup>[22]</sup>。采用上述 2 种净化方式对样液进行净化, 得到结果如图 2 所示, 直接过滤纸将较难对样液进行浓缩处理, 从而导致特征峰的峰面积过低, 同时仍然存在较多杂质且响应较大, 而采用 MCX 固相萃取柱对婴幼儿配方乳粉样液进行则有明显改善, 此过程能方便对样液进行浓缩处理, 浓缩后可看出色谱图中特征峰的响应比较满意, 同时杂质较少, 杂质峰响应较低。因此采用 MCX 固相萃取柱法能够达到预期效果。

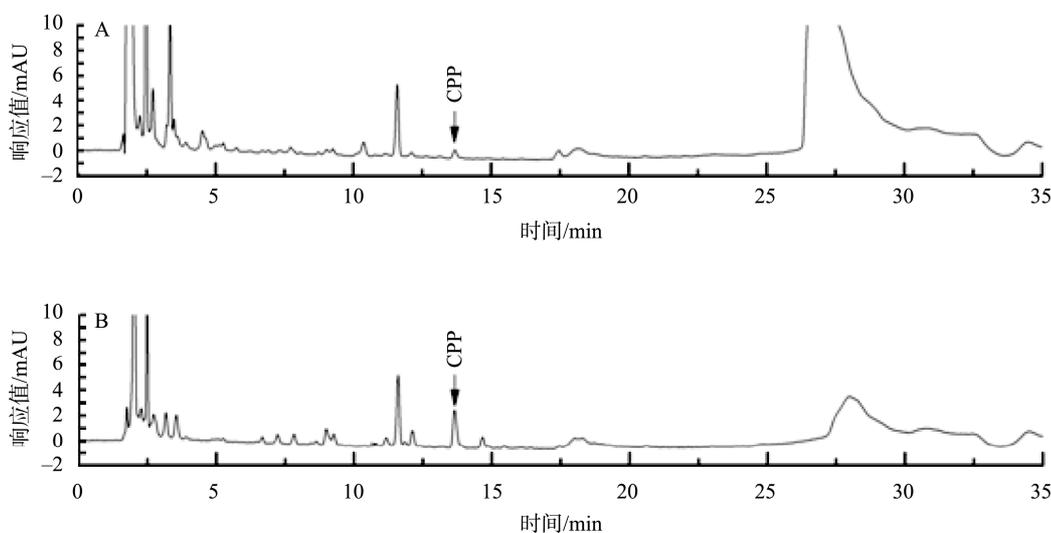
### 2.4 婴幼儿配方乳粉样品色谱条件优化

#### 2.4.1 色谱柱的选择

本研究选择了 2 种色谱柱进行比较: 色谱柱 1: ZORBAX Eclipse AAA 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 色谱柱 2: YMC-Pack ODS-AQ(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)。实验结果如图 3~4, 采用 ZORBAX Eclipse AAA 柱对 CPP 有良好的分离效果, 且特征峰峰面积更大, 能够满足实验需求。

#### 2.4.2 流动相的选择

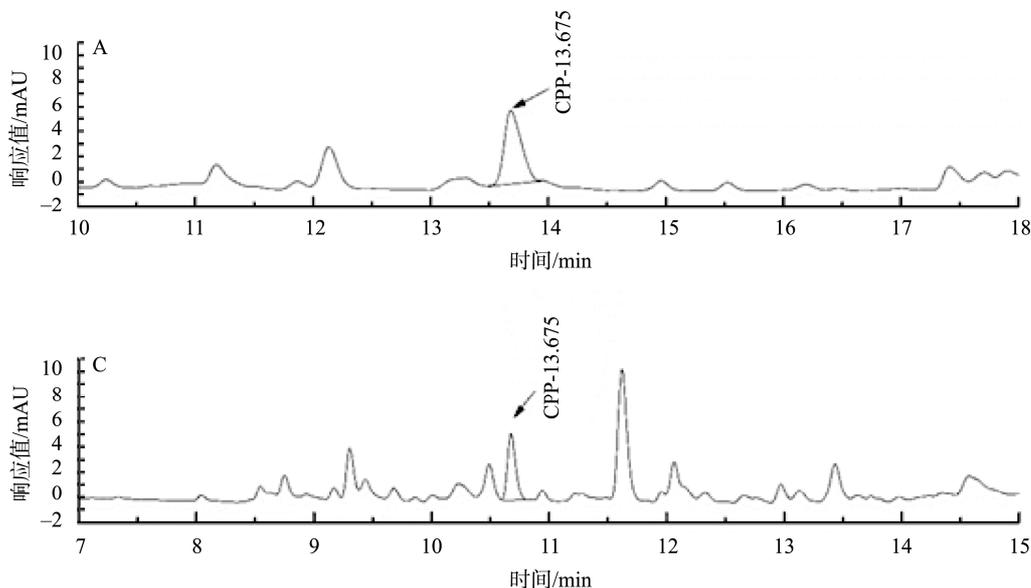
本研究选用了 2 种流动相溶液进行分析比较。流动相方案 1: 含 0.1%乙酸的乙腈与含 0.1%乙酸的水; 流动相方案 2: 含 0.08%三氯乙酸的乙腈与含 0.08%三氯乙酸的水。实验结果如图 5 所示。结果显示流动相采用方案 1 能够对特征峰有良好的分离效果, 而方案 2 则分离效果不如方案 1。因此采用方案 1: 含 0.1%乙酸的乙腈与含 0.1%乙酸的水, 能够满足实验需求。



注: A 为采用滤纸过滤, B 为采用 MCX 固相萃取柱净化。

图 2 2 种净化方式色谱结果

Fig.2 Chromatographic results of 2 purification methods



注: A 为使用色谱柱 1, B 为使用色谱柱 2。

图 3 CPP(300 µg/mL)在 2 种色谱柱下测定的色谱图

Fig.3 Chromatograms of CPP (300 µg/mL) determination under 2 chromatographic columns

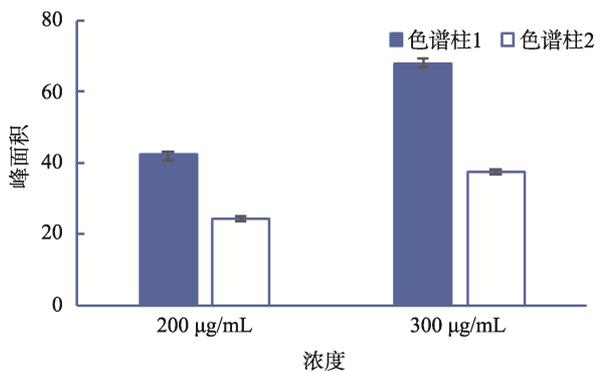


图 4 CPP 在 2 种色谱柱下测定的峰面积比较( $n=3$ )

Fig.4 Comparison of CPP peak areas determined by 2 chromatographic columns ( $n=3$ )

#### 2.4.3 流动相的选择

本研究选用了 2 种流动相溶液进行分析比较。流动相方案 1: 含 0.1%乙酸的乙腈与含 0.1%乙酸的水; 流动相方案 2: 含 0.08%三氟乙酸的乙腈与含 0.08%三氟乙酸的水。实验结果如图 5 所示。结果显示流动相采用方案 1 能够对特征峰有良好的分离效果, 而方案 2 则分离效果不如方案 1。因此采用方案 1: 含 0.1%乙酸的乙腈与含 0.1%乙酸的水, 能够满足实验需求。

### 2.5 方法的线性、重复性、定量限、加标回收结果

#### 2.5.1 线性结果

采用优化方案, 对系列标准工作溶液进行色谱分析,

以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线, 100~500 µg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数  $r^2=0.9994$ 。通过对空白样液进行 11 次实验, 得到对应噪音数据, 依据 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》<sup>[23]</sup>中对检出限量限的计算方式  $x_{LOD}=3S_{y/x}/b$ , 得出检出限为 0.140 mg/100 g, 定量限为 0.421 mg/100 g, 该方法有良好的灵敏性。

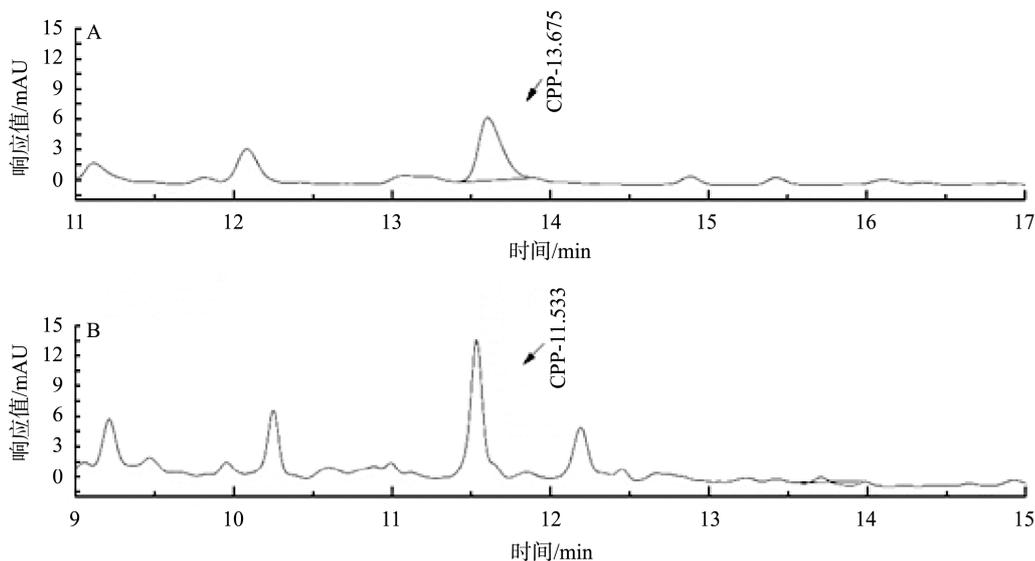
#### 2.5.2 重复性和加标回收结果

选取某市售添加 CPP 的婴幼儿配方乳粉, 采用优化方案对其进行 7 次平行测定, 所得重复性结果如表 3, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)为 3.64%, 精密度良好。

选取某市售未添加 CPP 婴幼儿配方乳粉, 采用优化方案对其进行加标测定, 所得结果如表 4。回收率为 81.06%~87.78%(RSD < 2.72%), 说明方法重复性良好, 回收率稳定。计算加标回收率, 对回收率进行显著性分析, 取置信概率 95%, 自由度为 8, 得  $T=18.89 > T_{0.05}$ , 表明该方法计算结果需引入回收率。

### 2.6 实际样品测定

选取 3 种不同含有 CPP 的婴幼儿配方乳粉 A、B、C 和 1 种未添加 CPP 的婴幼儿配方乳粉 D, 对其进行测定, 测定结果如下表 5。该方法能够满足婴幼儿配方乳粉中 CPP 含量的检测。



注: A 为使用流动相方案 1, B 流动相方案 2。

图 5 CPP 在 2 种流动相下测定的特征峰峰面积比较

Fig.5 Comparison of chromatographic peak areas of CPP determined by two mobile phase schemes

表 3 方法精密度  
Table 3 Precision of the method

编号	称样量/g	CPP 含量/(mg/100 g)	相对标准偏差/%
1	2.0094	74.7	
2	2.0049	77.0	
3	2.0140	70.2	
4	2.0218	72.8	3.64
5	2.0095	72.0	
6	2.0166	70.1	
7	2.0130	70.2	

表 4 加标回收实验数据  
Table 4 Standard recovery experiment data

加标量/mg	回收率/%	平均回收率/%	标准偏差/%	RSD/%
1.685	83.16			
1.685	87.78			2.72
1.685	86.05			
3.371	81.41			
3.371	81.06	83.4	2.20	0.49
3.371	81.85			
5.056	82.71			
5.056	83.82			0.67
5.056	83.20			

表 5 3 种不同样品中 CPP 含量测定结果  
Table 5 The CPP content determination results of 3 different sample

样品编号	标称值/(mg/100 g)	本方法检测结果/(mg/100 g)
婴幼儿配方乳粉 A	62	76.8
婴幼儿配方乳粉 B	62	72.1
婴幼儿配方乳粉 C	62	78.5
婴幼儿配方乳粉 D	无	未检出

### 3 结果与讨论

本实验探究了测定婴幼儿配方乳粉中 CPP 含量的前处理条件和色谱条件, 通过对前处理步骤中沉淀并去除蛋白质杂质的方法进行优化, 确定采用三氯乙酸调节 pH、过 MCX 固相萃取柱净化样液能够有效去除蛋白质对 CPP 检测的干扰; 同时实验还对色谱柱及流动相进行了选择比较, 发现采用 ZORBAX Eclipse AAA 色谱柱、含 0.1% 乙酸的乙腈与含 0.1% 乙酸的水作为流动相进行梯度洗脱, 能够取得特征峰良好的分离效果, 最终建立了测定婴幼儿配方乳粉中 CPP 含量的高效液相色谱法。该方法存在高效液相色谱法测定乳粉中 CPP 的普遍局限, 即需获得婴幼儿配方奶粉对应批次的 CPP 原料并以之作为参考物质<sup>[24]</sup>。但该方法具备良好的重复性和稳定性, 检出限低, 能够满足对婴幼儿配方乳粉中 CPP 含量的日常检测。

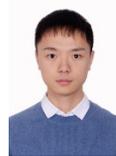
#### 参考文献

[1] 房玉国. 婴幼儿乳粉 配方 VS 普通有什么不一样? [N]. 中国质量报, 2020-07-02(005).  
FANG YG. For infant milk powder, what's the difference between formula

- and ordinary? [N]. China Quality News, 2020-07-02(005).
- [2] 王玉莹, 陈锡威, 冯凤琴, 等. 酪蛋白磷酸肽的研究进展[J]. 食品工业, 2014, 35(5): 204–208.  
WANG YY, CHEN XW, FENG FQ, *et al.* Research progress in casein phosphopeptides [J]. Food Ind, 2014, 35(5): 204–208.
- [3] CROSS KJ, HUQ NL, REYNOLDS EC. Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(8): 793–800.
- [4] PEREGOVA S, ZABEOVA A, MARASCO E, *et al.* Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel [J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(2): 847–857.
- [5] MIQUEL E, FARRÉ R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability [J]. *Trend Food Sci Technol*, 2007, 18(3): 139–143.
- [6] HANSEN M, SANDSTROEM B, JENSEN M, *et al.* Effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from breadmeals [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 1997, 11(3): 143–149.
- [7] NICHOLAS JA, ERIC CR. Relationship between degree of casein hydrolysis and phosphopeptide release [J]. *J Dairy Res*, 1997, (64): 505–514.
- [8] 徐曼. 酪蛋白磷酸肽的制备及其持钙能力的研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2011.  
XU M. Preparation of casein phosphopeptide and its calcium holding capacity [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2011.
- [9] 刘炜, 冯凤琴, 施林巍. 新型功能性食品添加剂-酪蛋白磷酸肽的结构、功能及应用[C]. 中国食品添加剂生产应用工业协会, 营养强化剂及特种营养食品篇, 2003: 307–312.  
LIU W, FENG FQ, SHI LW. A new functional food additive-casein phosphopeptides [C]. China Association of Food Additiv-Production and Application Industry, 2003: 307–312.
- [10] 田随安, 张向兵, 李永利. HPLC 法测定保健食品中酪蛋白磷酸肽[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, (2): 273, 306.  
TIAN SA, ZHANG XB, LI YL. Method of HPLC to detect content of CPP in health food [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, (2): 273, 306.
- [11] GB 14880—2012 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准[S].  
GB 14880—2012 National food safety standard-Food nutrition fortifier use of standards [S].
- [12] 牟光庆, 张丽萍, 王立民, 等. 毛细管区带电泳测定酪蛋白磷酸肽方法的研究[J]. 中国食品学报, 2002, (2): 21–24.  
MU GQ, ZHANG LP, LI LM, *et al.* A study on determination method of casein phosphopeptides using capillary zone electrophoresis [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2002, (2): 21–24.
- [13] NICHOLAS A, PETER F, RILEY, *et al.* The analysis of multiple phosphoserine-containing casein peptides using capillary zone electrophoresis [J]. *Chromatography*, 1993, (646): 391–396.
- [14] GB 31617—2014 食品安全国家标准 食品营养强化剂 酪蛋白磷酸肽[S].  
GB 31617—2014 National food safety standard-Food nutrition fortifier-Casein phosphopeptides [S].
- [15] 杜鹃, 王倩倩, 闫永刚, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中酪蛋白磷酸肽含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(5): 1161–1167.  
DU J, WANG QQ, YAN YG, *et al.* Determination of casein phosphopeptides in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(5): 1161–1167.
- [16] KOSALKOVA K, GARCIA-ESTRADA C, BARREIRO C, *et al.* Casein phosphopeptides drastically increase the secretion of extracellular proteins in *Aspergillus awamori*. Proteomics studies reveal changes in the secretory pathway [J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, (11): 1–15.
- [17] 李则均. 高效液相色谱法测定婴幼儿配方羊奶粉中酪蛋白磷酸肽含量[J]. 中国乳业, 2017, 182(2): 66–70.  
LI ZJ. The content of casein phosphopeptide in infant formula sheep milk powder was determined by high performance liquid chromatography [J]. *Chin Dairy*, 2017, 182(2): 66–70.
- [18] 张帅, 刘飞, 罗珍, 等. 高效液相色谱法测定钙片中酪蛋白磷酸肽的含量[J]. 现代食品科技, 2014, 30(7): 258–262, 285.  
ZHANG S, LIU F, LUO Z, *et al.* Determination of casein phosphopeptides in calcium tablets by high performance liquid chromatography [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, 30(7): 258–262, 285.
- [19] 胡蓓, 张京顺, 柯星, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿配方奶粉中酪蛋白磷酸肽含量[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 286–291.  
HU P, ZHANG JS, KE X, *et al.* Determination of casein phosphopeptides in infant formula by HPLC-MS/MS [J]. *Food Sci*, 2018, 39(18): 286–291.
- [20] OLUMEE-SHABON Z, BOEHMER JL. Detection of casein phosphopeptides in goat milk [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(6): 3034–3041.
- [21] 孙圣伟. 酪蛋白磷酸肽体内活性对比及其促钙吸收机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.  
SUN SW. Study on activity comparison of casein phosphopeptides in vivo and in vitro and mechanism of calcium absorption [D]. Guangzhou: South China Agricultural university, 2018.
- [22] 唐婷, 马力. 酪蛋白磷酸肽的营养作用及其应用[J]. 中国食物与营养, 2008, 2(3): 28–29.  
TANG T, MA L. Nutritional function and application of casein phosphopeptides [J]. *Food Nutr Chin*, 2008, 2(3): 28–29.
- [23] GB/T 27417—2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S].  
GB/T 27417—2017 Conformity assessment-Guidelines for validation and verification of chemical analysis methods [S].
- [24] 邵琪, 魏丽娜, 张东丽, 等. 酪蛋白磷酸肽检测方法研究进展[J]. 食品研究与发展, 2019, 40(3): 220–224.  
SHAO Q, WEI LN, ZHANG DL, *et al.* Research progress of the detection methods on casein phosphopeptides [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(3): 220–224.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



葛 城, 硕士, 主要研究方向为乳品检测。

E-mail: gecheng@ausnutria.com



张 浩, 主要研究方向为乳品检测。

E-mail: hao.zhang@ausnutria.com



周 钧, 硕士, 工程师, 主要研究方向为实验室管理和乳品质量控制工作。

E-mail: junzhou@ausnutria.com